

Uso de una proteasa para la construcción de una curva de calibración de enzima utilizando la técnica de zimografía



Bentos, Maia (Colegio Nacional de Buenos Aires)
García, Ximena (Instituto Libre de Segunda Enseñanza)
Vizcaya, Andrea (Instituto Ind. Luis A. Huergo)

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires
Laboratorio de Química de proteoglicanos y matriz extracelular
Departamento de Química Biológica



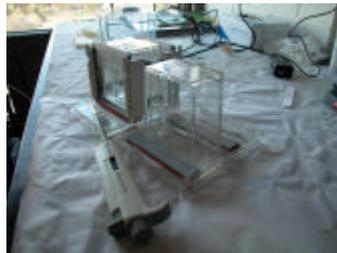
Tutor: Calvo, Juan Carlos

INTRODUCCION

En el desarrollo de tejidos y órganos, como así también en procesos tales como la invasión celular, la matriz que rodea a la célula, debe remodelarse para permitir el movimiento celular. Para ello se activan las metaloproteasas, enzimas con actividad degradativa de proteínas de la matriz extracelular, que dependen de la presencia de iones metálicos para su funcionamiento. Parte del estudio de las mismas requiere su cuantificación en geles de zimografías. Este trabajo requiere la utilización de una proteasa "patrón" (colagenasa) para construir una curva de calibración contra la cual comparar la actividad de metaloproteasas de medios de cultivo.

MATERIALES Y METODOS

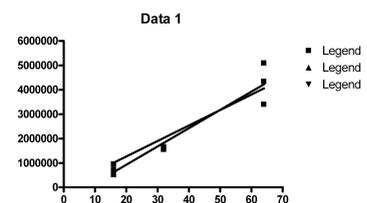
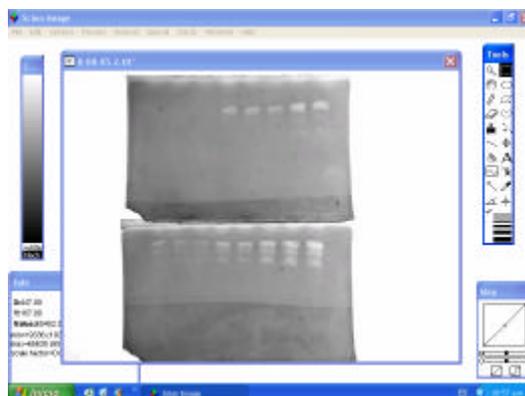
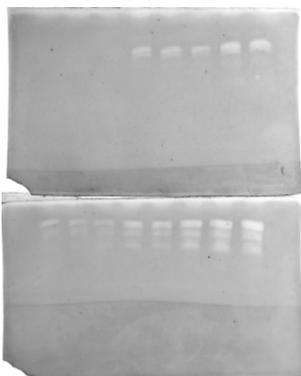
La determinación de la actividad de metaloproteasas (gelatinasas) se realiza mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%, con SDS (dodecil sulfato de sodio) en los que se incluyó gelatina en la constitución. Al sembrarse las muestras, las bandas proteicas se distribuirán de acuerdo a su masa, migrando todas hacia el polo positivo por su carga neta negativa, debido al SDS y al pH del buffer de separación. Una vez finalizada la corrida, los geles se incuban, secuencialmente en Tritón X-100 al 2.5% (para eliminar el SDS) y, luego, en buffer salino para eliminar el Tritón y permitir determinar la actividad enzimática. Luego de una incubación de toda la noche, el gel se tiñe con una solución de Coomassie Blue que, al unirse a las proteínas, dejará un fondo azul homogéneo por la presencia de gelatina, con bandas incoloras donde se encontraba la actividad enzimática. El gel, así teñido, es fotografiado y la imagen analizada mediante el programa Scion-Image para cuantificar el área de cada banda.



Estas figuras muestran el aparato para electroforesis utilizado en la experiencia.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

En las figuras que siguen se muestran los resultados de la corrida de cantidades variables de colagenasa en un estudio por zimografía (en la imagen de un gel convertida a grises), la pantalla de análisis de la fotografía del gel con el programa Scion Image y la curva de correlación entre la intensidad de cada banda y la concentración proteica correspondiente.



Estos resultados demuestran que la técnica es apropiada para la correlación de actividad enzimática (determinada como cantidad de una enzima patrón) con la intensidad de la banda obtenida en un gel de zimografía, obteniéndose una relación lineal. Esto será utilizado en experimentos con medios de cultivo de células que producen metaloproteasas (gelatinasas) para su cuantificación.